

# 復旦大學

## 本科畢業論文



論文題目：牛磺脫氧膽酸和牛磺熊去氧膽酸抑制腸道脂質吸收的  
機制研究

姓 名： 謝林珊 學 號： 20300220008

院 系： 生命科學學院

專 業： 生物科學

指導教師： 洪尚宇 職 稱： 研究員

單 位： 復旦大學生命科學學院

完成日期： 2024 年 05 月 20 日

# 牛磺脱氧胆酸和牛磺熊去氧胆酸抑制肠道脂质吸收的机制研究

完成人

谢林珊

指导小组成员

洪尚宇 研究员

# 目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前言	1
1.1 生酮饮食与肥胖	1
1.1.1 肥胖的流行病学特征	1
1.1.2 生酮饮食概述	1
1.2 生酮饮食与糖脂代谢	2
1.3 生酮饮食与胆汁酸代谢	3
1.3.1 胆汁酸的生理代谢	3
1.3.2 生酮饮食调控特异性胆汁酸的代谢	5
1.3.3 TDCA 和 TUDCA 通过抑制能量吸收介导小鼠代谢表型的变化	6
1.4 本研究的目的、框架及意义	6
二、材料与amp;方法	8
2.1 材料	8
2.2 试剂及仪器	8
2.2.1 试剂	8

2.2.2 仪器	9
2.3 实验方法	9
2.3.1 动物模型构建	9
2.3.2 胆汁酸干预实验	10
2.3.3 荧光脂质吸收实验	11
2.3.4 高通量转录组测序及 RT-qPCR 验证	11
2.3.4.1 高通量转录组测序	11
2.3.4.2 RNA 逆转录反应 (RT-PCR)	12
2.3.4.3 实时荧光定量 PCR 反应 (qPCR)	12
2.3.5 检测方法	13
2.3.5.1 空腹血糖水平检测	13
2.3.5.2 肝脏脂质的提取和 TG 水平检测	13
2.3.5.3 肝脏组织切片的油红 O 染色	14
2.3.6 统计学方法	14
三、研究结果	15
3.1 TDCA 和 TUDCA 抑制小鼠肠道的脂质吸收	15
3.2 TDCA 和 TUDCA 通过下调 <i>Car1</i> 的表达抑制小鼠肠道的脂质吸收	16
3.3 TDCA 和 TUDCA 在 DIO 和 <i>ob/ob</i> 小鼠肥胖治疗方面的应用前景	17
3.3.1 TDCA 和 TUDCA 显著降低 DIO 和 <i>ob/ob</i> 小鼠的体重	18

3.3.2 TDCA 和 TUDCA 显著降低 DIO 和 <i>ob/ob</i> 小鼠的空腹血糖水平	18
3.3.3 TDCA 和 TUDCA 显著降低 DIO 和 <i>ob/ob</i> 小鼠肝脏脂质积累...	19
3.3.4 TDCA 和 TUDCA 显著降低对 DIO 和 <i>ob/ob</i> 小鼠肝脏甘油三酯水 平.....	20
四、讨 论 .....	21
参考文献 .....	23
致谢 .....	27

# 摘要

随着经济和社会的不断发展，肥胖的患病率正在逐年升高。肥胖会增加个体罹患高血压、糖尿病等疾病的风险，已成为影响全球人民健康的重要公共卫生问题。生酮饮食（KD）作为一种特殊的饮食模式，能够在短期内降低体重，然而其具体的分子机制尚未明确。本课题组前期研究发现，KD 消耗能够上调小鼠和人体的循环牛磺脱氧胆酸（TDCA）和牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）水平，TDCA 和 TUDCA 治疗通过增加小鼠的能量外排水平导致体重减轻。上游机制上，KD 消耗通过抑制编码胆盐水解酶的肠道微生物丰度降低 TDCA 和 TUDCA 的解偶联，导致其循环水平上调。然而，TDCA 和 TUDCA 增加能量外排的具体分子机制仍然未知。首先，本研究通过荧光探针活体染色实验为 TDCA 和 TUDCA 抑制肠道脂质吸收提供了直接证据。其次，通过对胆汁酸治疗小鼠的肠道组织进行高通量转录组测序分析，发现 TDCA 和 TUDCA 能够显著下调肠道碳酸酐酶 1 的表达，这可能是其抑制脂质吸收的潜在分子靶点。最后，我们发现 TDCA 和 TUDCA 能够显著降低肥胖小鼠的体重、空腹血糖水平及肝脏脂质积累水平。综上所述，本研究进一步阐明了 TDCA 和 TUDCA 抑制肠道脂质吸收的潜在分子机制，为肥胖及其并发症的治疗提供了新的候选药物和分子靶点。

**关键词：** 生酮饮食，牛磺脱氧胆酸，牛磺熊去氧胆酸，脂质吸收，碳酸酐酶 1

# Abstract

The prevalence of obesity is increasing year by year as the economy and society continue to develop. Obesity increases an individual's risk of developing diseases such as hypertension and diabetes, and has become an important public health problem affecting people's health worldwide. Ketogenic diet (KD), as a special dietary pattern, can reduce body weight in the short term, however, its specific molecular mechanism has not been clarified. The previous study of our group found that KD consumption was able to upregulate circulating taurodeoxycholic acid (TDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) levels in mice and humans, and that TDCA and TUDCA treatments led to weight loss by increasing energy efflux levels in mice. Mechanistically, KD depletion reduced the uncoupling of TDCA and TUDCA by inhibiting the abundance of gut microbes encoding bile salt hydrolases, leading to upregulation of their circulating levels. However, the specific molecular mechanisms by which TDCA and TUDCA increase energy efflux remain unknown. First, the present study provides direct evidence that TDCA and TUDCA inhibit intestinal lipid absorption by fluorescent probe in vivo staining experiments. Second, high-throughput transcriptome sequencing analysis of intestinal tissues from bile acid-treated mice revealed that TDCA and TUDCA were able to significantly down-regulate the expression of intestinal carbonic anhydrase 1, which may be a potential molecular target for their inhibition of lipid absorption. Finally, we found that TDCA and TUDCA were able to significantly reduce body weight, fasting blood glucose level and hepatic lipid accumulation level in obese mice. In summary, the present study further elucidated the potential molecular mechanisms of TDCA and TUDCA in inhibiting intestinal lipid absorption, which provides new drug candidates and molecular targets for the treatment of obesity and its complications.

**Key words:** Ketogenic Diet, Taurodeoxycholic Acid, Tauroursodeoxycholic Acid, lipid absorption, Carbonic Anhydrase 1

# 一、前言

## 1.1 生酮饮食与肥胖

### 1.1.1 超重与肥胖的流行病学特征

肥胖，被世界卫生组织（WHO）定义为“一种对健康构成风险的异常或过度脂肪积累”<sup>[1]</sup>，已成为一个重要的全球公共卫生问题<sup>[2]</sup>。身体质量指数（BMI）是衡量肥胖的一大重要标准，根据 BMI 的水平，可将人群分为消瘦（ $BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$ ）、正常（ $18.5 \leq BMI < 25$ ）、超重（ $25 \leq BMI < 30$ ）以及肥胖（ $30 \leq BMI$ ）<sup>[3]</sup>。世界肥胖联盟的统计数据显示，2020 年，全球范围内超重及肥胖的成人人数已达 22 亿，占比达到了全球成年人总人数的 42%，而到 2035 年，这个人数将达到 33 亿，占比也将增加至 54%<sup>[4]</sup>。肥胖与不同的慢性严重疾病的发生发展有着密切的关联，包括糖尿病、心脏代谢性疾病、高血压、高脂血症和恶性肿瘤<sup>[5-6]</sup>。虽然肥胖和超重的发病机制受到遗传和环境因素的共同影响，但人们普遍认为，体重增加的主要原因是过度能量摄入和能量消耗不足之间的持续不平衡<sup>[7-9]</sup>。尽管人们提出了各种减肥策略，但它们的长期效果是有限的。因此，应对不断升级的超重和肥胖流行趋势，人们迫切需要创新的方法来补充现有的战略。

### 1.1.2 生酮饮食概述

人们提出了各种不同的饮食方案来减肥，其中，限制碳水化合物的摄入被认为是减肥的最有效的方法之一<sup>[10]</sup>。而生酮饮食也被认为比其他多种饮食方案对治疗肥胖更有效。生酮饮食（KD）是一种含低碳水化合物（5%-10%）、高脂肪（70-80%）、中等蛋白质（15%-20%）的饮食，其通过模仿空腹状态的新陈代谢以诱导酮体的产生<sup>[11]</sup>。1921 年，Russel Wilder 提出生酮饮食可以像禁食一样达到治疗癫痫的作用，并将这种饮食模式命名为“生酮饮食”<sup>[12]</sup>。根据疗效，现已开发出与原始形式相似的变体 KD，主要分为四种类型：经典的长链甘油三酯生酮饮食（LCTKD）、中链甘油三酯生酮饮食（MCTKD）、阿特金斯饮食法改良版生酮饮食（MAD）和低血糖指数改良版生酮饮食（图 1）。

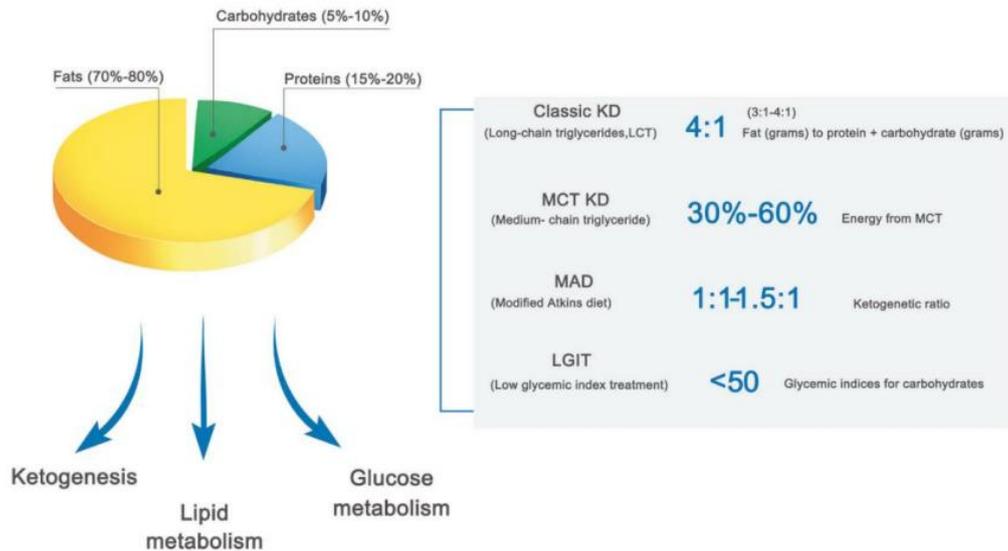


图 1 生酮饮食的营养组成及常见的生酮饮食类型<sup>[13]</sup>

KD 长期以来一直被认为是治疗顽固性癫痫的一种饮食疗法，在过去十年中迅速引起了越来越多的研究关注，但有新证据表明 KD 对癫痫以外的各种疾病，如超重和肥胖、神经系统疾病、T2DM、癌症、肠道疾病和呼吸系统疾病等具有较大的治疗潜力<sup>[14-15]</sup>。在一项包含 20 名接受生酮饮食治疗的参与者的对照研究中，在坚持服用 KD 8 周后观察到了包括 BMI、低密度脂蛋白含量 (LDL-C)、血清甘油三酯、胰岛素的显著降低。在一项纳入 20 名接受低热量生酮饮食的参与者的对照研究中，在服用 KD 8 周后观察到包括 BMI、LDL-C、甘油三酯 (TG)、胰岛素血症和肝谷丙转氨酶、谷草转氨酶等生化参数的显著改善<sup>[16]</sup>。在啮齿类动物中的研究表明，在饲喂生酮饮食后啮齿类动物也呈现出体重的明显的减轻<sup>[17-18]</sup>。

## 1.2 生酮饮食与糖脂代谢

由于生酮饮食中含有极低比例的碳水化合物<sup>[19]</sup>，因此在碳水化合物的摄入被高度限制后，人机体内储存的葡萄糖不足以在三羧酸循环中产生草酰乙酸<sup>[20]</sup>，从而将迫使机体进入酮体代谢模式<sup>[21]</sup>（图 2）。

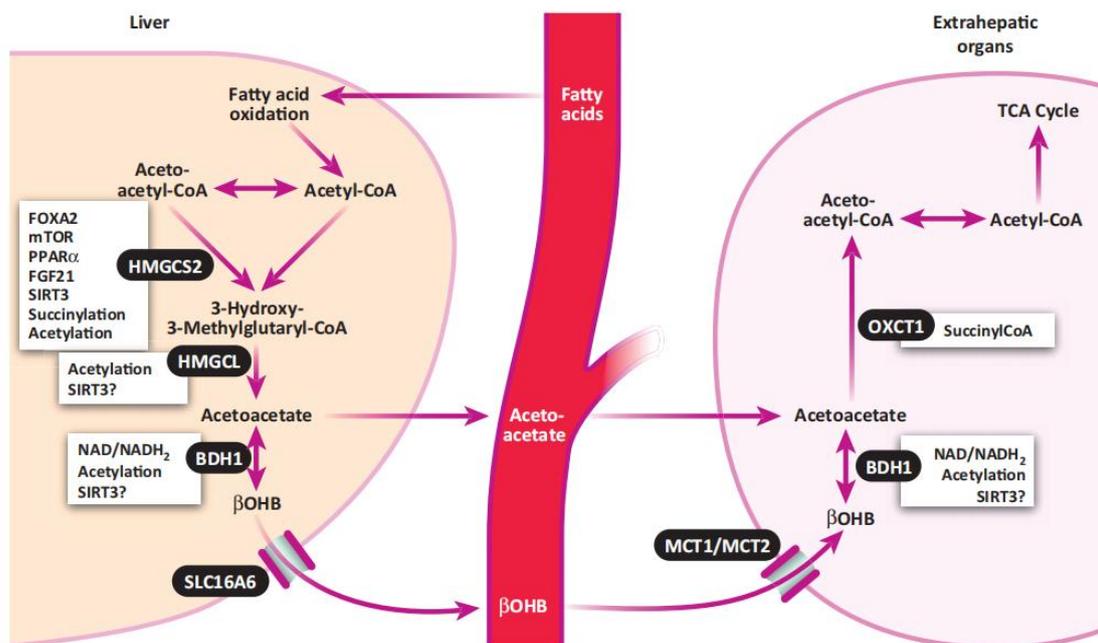


图 2 生酮饮食中涉及的代谢途径<sup>[22]</sup>

机体内的酮体主要产生在肝脏中。在肝脏线粒体中，脂肪酸先通过 $\beta$ -氧化生成乙酰辅酶 A (Acetyl - CoA)，两分子乙酰辅酶 A 发生缩合，形成乙酰乙酰辅酶 A (Aceto - acetyl - CoA)。随后，乙酰乙酰辅酶 A 再与第三个乙酰辅酶 A 缩合，形成 HMG-CoA。而后，HMG-CoA 裂解酶 (HMGCL) 将 HMG - CoA 裂解，生成乙酰辅酶 A 和乙酰乙酸 (Acetoacetate)。肝脏线粒体总共可以产生三种循环酮体，分别是乙酰乙酸、 $\beta$ OHB 和丙酮<sup>[23]</sup>。而前一步的分解产物乙酰乙酸正式是另外两个循环酮体丙酮和 $\beta$ OHB 的共同前体，其中 $\beta$ OHB 是最主要的循环酮体，乙酰乙酸在 $\beta$ -羟基丁酸脱氢酶的催化下可被转化为 $\beta$ OHB。

酮体在肝脏线粒体产生后，可进入血液循环被运往全身。当酮体被相应组织吸收后，会在相应酶的作用下转化回乙酰乙酸，随后可被转化为乙酰辅酶 A，并进入三羧酸循环中氧化和产生 ATP 为机体供能<sup>[24]</sup>。

### 1.3 生酮饮食与胆汁酸代谢

#### 1.3.1 胆汁酸的生理代谢

胆汁酸 (BAs) 是两亲性胆固醇代谢物<sup>[25]</sup>。胆汁酸能够乳化膳食脂质，将它们从脂肪球转化为微小的液滴，从而便于被胰酶消化以及被肠道吸收<sup>[26]</sup>。BAs

还可以通过将脂质并入胶束来助力其吸收(如脂溶性维生素 A、D、E、K 等)<sup>[27-28]</sup>。此外, BAs 是调节胆汁酸生物合成、脂质以及葡萄糖稳态和免疫信号转导过程的重要激素<sup>[29]</sup>。肥胖相关的代谢性疾病, 包括 2 型糖尿病和非酒精性脂肪肝病, 也与胆汁酸稳态失调有关<sup>[30]</sup>。

机体内的胆汁酸主要由肝细胞合成并储存在胆囊中的初级 BAs 和作为细菌代谢产物的次级 BAs 组成<sup>[31]</sup>。在哺乳动物中, 有两种主要的生物合成途径可以形成初级胆汁酸, 即通过胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (CYP7A1) 催化的经典合成途径或通过甾醇 27-羟化酶 (CYP27A1) 催化的酸性合成途径<sup>[32]</sup>。

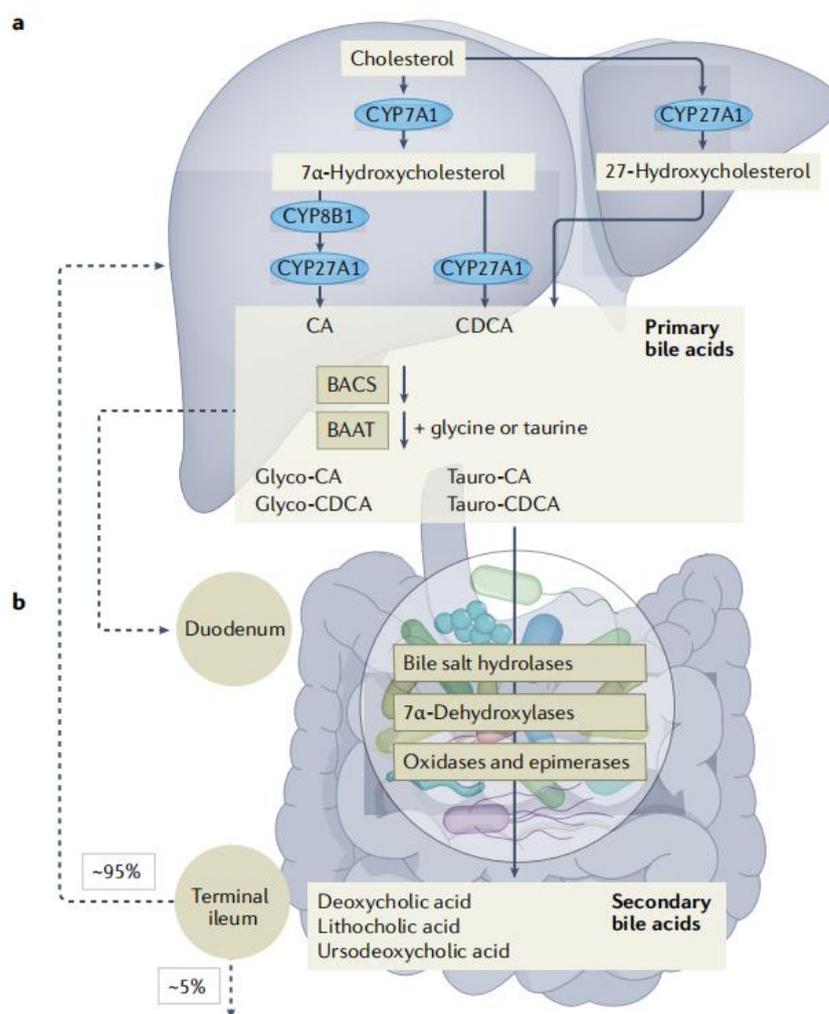


图 3 胆汁酸的肠肝循环<sup>[33]</sup>

如图 3 所示是人体内胆汁酸的肠肝循环过程, 人体内产生的初级 BAs 包括胆酸 (CA) 和鹅去氧胆酸 (CDCA)<sup>[34]</sup>。在小鼠体内, 除了人体能够产生的 CA

和 CDCA，还能产生鼠胆酸（MCA）和熊去氧胆酸（UDCA）<sup>[35]</sup>。初级 BAs 在机体内与甘氨酸（G）或牛磺酸（T）结合（在小鼠体内主要是和牛磺酸结合），形成储存在胆囊中的胆盐<sup>[36]</sup>。当有食物摄入时，BAs 即可从胆囊被释放到十二指肠，肠道微生物即沿着胆汁酸的流动路径继续代谢它们<sup>[37]</sup>。在 BAs 到达回肠末端之前，大约有 95% 的 BAs 会通过被动和主动运输被重吸收，回到肝脏<sup>[38]</sup>。另外 5% 的 BAs 进入结肠，在肠道微生物的作用下通过脱羟基化促进主要次生 BAs 的产生。

### 1.3.2 生酮饮食调控特异性胆汁酸的代谢

在本课题组的前期研究中，使用生酮饮食（KD）和对照饮食（CD）分别对 C57BL/6J 小鼠进行为期 7 周的饮食干预，观察到小鼠体重和空腹血糖水平的显著降低，6 种牛磺酸结合型胆汁酸（BAs）在 KD 组小鼠血清中显著富集。BAs 谱和代谢表型（体重和空腹血糖水平）相关性分析的结果进一步显示：在 KD 中富集的 6 种牛磺酸结合型 BAs 与小鼠的体重和空腹血糖水平呈现显著的负相关。为验证这些牛磺酸结合型胆汁酸水平变化与代谢表型变化间的因果关系，使用市场上可买到的其中 4 种牛磺酸结合型胆汁酸对 CD 饮食背景下的小鼠进行了回补实验，所用到的 4 种牛磺酸结合型胆汁酸包括：牛磺脱氧胆酸（TDCA）、牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）、牛磺胆酸（TCA）和牛磺鹅去氧胆酸（TCDC）。发现，与溶剂对照组相比，只有 TDCA 和 TUDCA 的回补能够引起小鼠体重和空腹血糖水平的显著降低<sup>[39]</sup>。

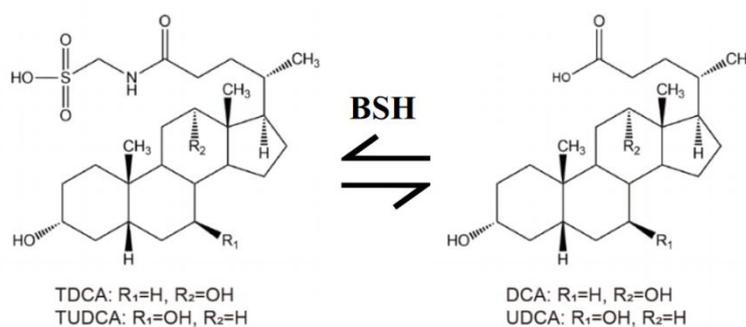


图 4 TDCA 及 TUDCA 的解偶联

胆汁酸可以促进肠道对脂质、营养物质和维生素的吸收和运输<sup>[40]</sup>。而胆汁酸的解偶联反应是由具有胆盐水解酶（BSH）活性的细菌进行的<sup>[41]</sup>（图 4）。与其

他微生物的生态系统相比，BSH 在肠道微生物群中富集，并与增加对胆汁毒性的抵抗力有关<sup>[42]</sup>。而生酮饮食能够有效降低肠道微生物编码 BSH 的丰度，从而导致 TDCA 和 TUDCA 解偶联的减少。

### 1.3.3 TDCA 和 TUDCA 通过抑制能量吸收介导小鼠代谢表型的变化

进一步地，使用 CLAMS 代谢监测系统监控 TDCA 或 TUDCA 治疗期间小鼠的运动以及摄食饮水情况的结果显示：TDCA 或 TUDCA 治疗并不会影响小鼠的能量摄入和消耗水平。而使用氧弹量热仪对小鼠干燥粪便的中热量的测量结果则表明：TDCA 和 TUDCA 能够显著增加小鼠粪便中的卡路里排泄，这说明 TDCA 和 TUDCA 是通过抑制能量吸收来造成小鼠体重和空腹血糖水平的降低<sup>[43]</sup>（总机制图见图 5）。

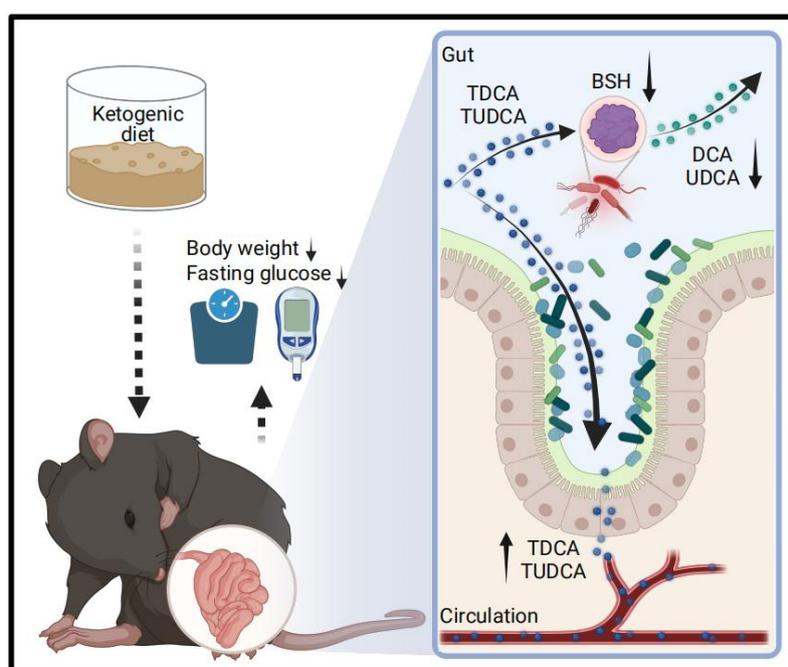


图 5 生酮饮食调控小鼠代谢表型及特异性胆汁酸代谢机制总图

## 1.4 本研究的的目的、框架及意义

结合文献调研和课题组前期研究结果，得出结论：生酮饮食能够上调特异性牛磺酸结合型胆汁酸 TDCA 和 TUDCA 的水平，从而造成小鼠体重的减轻和空腹血糖水平的降低，而这种代谢表型的变化是通过抑制能量吸收导致的。因此，本课题旨在原研究的基础上，进一步探究 TDCA 和 TUDCA 对脂质吸收水平的

影响，并挖掘其潜在的作用靶点和信号通路，以明确 KD 通过特异性胆汁酸调控代谢表型的分子机制和应用前景。

本研究将主要聚焦于三个方面（图 6），分别为：① TDCA 和 TUDCA 对小鼠脂质吸收水平的影响；② 探索 TDCA 和 TUDCA 影响吸收的具体作用机制；③ 在两种常见的肥胖小鼠模型（饮食诱导的肥胖小鼠模型、瘦素基因突变的 *ob/ob* 肥胖小鼠模型）中进行 TDCA 和 TUDCA 治疗，在应用层面上探究特异性胆汁酸降低体重和空腹血糖含量的效果。为探究 TDCA 和 TUDCA 对小鼠脂质吸收水平的影响，预期采用荧光脂质吸收试验，通过对灌胃了 BODIPY 标记物小鼠的小肠绒毛进行成像，直观地对比肠道对脂质的吸收情况。在对于 TDCA 和 TUDCA 影响脂质吸收潜在机制的探索上，计划先进行一个开放性的 RNA-seq 实验，利用获得的数据进行分析后再进行基因的筛选和机制的摸索。最后，应用部分，分别在 *ob/ob* 小鼠和 DIO 小鼠的背景下进行了 TDCA 和 TUDCA 的治疗实验，探究其在体重、空腹血糖水平、肝脏脂质积累和相关生化指标的变化。

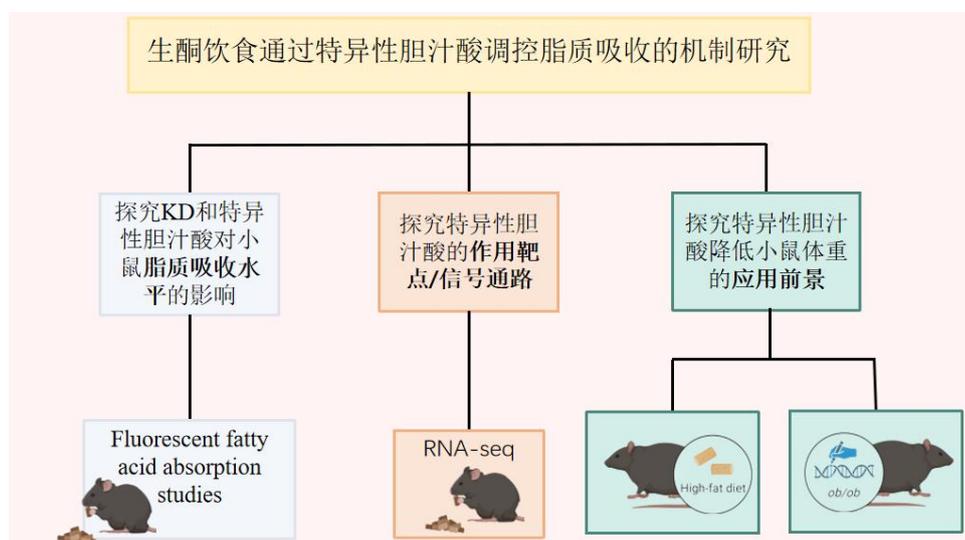


图 6 研究计划

通过本课题的研究，可以更加深刻理解 KD 以及 TDCA 和 TUDCA 两种特异性胆汁酸介导机体代谢表型发生改变的分子机制，明析两种胆汁酸对脂质吸收水平的影响。这为 TDCA 和 TUDCA 成为治疗肥胖和相关代谢疾病的新候选药物提供科学依据和理论基础。

## 二、材料与amp;方法

### 2.1 实验动物

本研究所使用的小鼠均为雄性，共涉及到两种小鼠（均购自江苏集萃药康生物技术有限公司）：C57BL/6J 小鼠以及瘦素基因特异性敲除的 *ob/ob* 小鼠。所有的小鼠都被饲养在包含稳定 12 小时的光/暗周期的清洁（SPF）级环境中。本研究符合实验动物管理与保护相关规定。

### 2.2 试剂及仪器

#### 2.2.1 试剂

名称	公司	货号
牛磺脱氧胆酸（TDCA）	Psaitong	S10082
牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）	Psaitong	A11270
BODIPY <sup>TM</sup> 500/510 C <sub>1</sub> , C <sub>12</sub>	Molecular Probes	D3823
标准饲料（CD）	Lab Diets	5C08
高脂饮食（High Fat Diet, HFD）	SYSE Bio-Tec. Co., Ltd.	PD6001
橄榄油	Sangon Biotech	A502795
饱和油红 O 溶液	Servicebio	G1015
Reverse Transcription Kit	Thermofisher	4368814
HiScriptIII qRT SuperMix	Vazyme	R323-01
ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	Vazyme	Q711-02/03
RNase free water	Ambion	AM9938
三氯甲烷（氯仿）	常熟市鸿盛精细化工有限公司	615531
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	10014118
丁醇	国药集团化学试剂有限公司	10005218
Triton X-100	北京索莱宝科技有限公司	T8200
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	80109218
蔗糖	国药集团化学试剂有限公司	10021418
1×PBS 缓冲液	Servicebio	G4202
OCT 包埋剂	Servicebio	G6059
甘油三酯（TG）测定试剂盒	南京建成生物工程研究所	A110-1-1

名称	公司	货号
Trizol	Thermofisher	15596018
TruePrep DNA Library Prep Kit V2 for Illumina	Vazyme	TD501

### 2.2.2 仪器

名称	公司	型号
万分之一电子天平	Sartorius	QUINTIX224-1CN
台式高速冷冻离心机	Sigma	3K15
血糖仪	Roche	Performa
迷你离心机	Eppendorf	MiniSpin
多功能酶标仪	Tecan Spark	Freedom EVOlyzer
冷冻型高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技有限公司	SCIENTZ-48LD
实时荧光定量 PCR 系统	Thermo Fisher	QuantStudio 7 Flex
包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
冰冻切片机	Thermo	CRYOSTAR NX50
电热恒温培养箱	上海博讯实业有限公司	HPX-9162MBE

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 动物模型构建

本研究共涉及三种实验动物，分别为饮食诱导的肥胖小鼠模型（DIO）、瘦素基因突变的肥胖小鼠模型（*ob/ob*）以及标准饲料（CD）饮食背景下的 C57BL/6J 实验型小鼠。

其中，喂食 C57BL/6J 型小鼠以高脂饮食（HFD）饲喂 10 周来塑造饮食诱导的肥胖模型（DIO），而 *ob/ob* 型小鼠是一种 C57BL/6J 型小鼠瘦素基因突变的近交品系，其特点为由于瘦素基因缺乏而导致的食欲过剩以及过量进食，是一种基因型肥胖模型。

### 2.3.2 胆汁酸干预实验

#### 胆汁酸母液的配置：

分别称取 TDCA 以及 TUDCA 粉末，按 1000 mg: 3000  $\mu$ L 的比例配置成 1:3 的胆汁酸母液，待使用时再进行稀释。胆汁酸干预的三个实验中所需的特异性胆汁酸浓度均为 0.5%，故在实验时，按照每 100 mL 溶液中添加 1.5 mL 胆汁酸母液配置成最终动物的实验饮水。

#### 实验方法细节：

##### ① 胆汁酸干预实验一

将喂食标准饲料的小鼠按照体重匹配，分为 3 组，每组 6 只，分别给予 0.5 % 浓度的 TDCA、TUDCA 以及正常饮用水，其中饮用正常饮用水的小鼠为对照组（CTR）。每隔 2 天记录小鼠的食物摄入以及饮水情况，并及时更换新的垫料和饮水。

##### ② 胆汁酸干预实验二

分别将 DIO 型小鼠和 *ob/ob* 型小鼠按照体重和空腹血糖水平匹配，分为 3 组，每组 6 只。在两个模型小鼠的三个组中分别给予给予 0.5 %浓度的 TDCA、TUDCA 以及正常饮用水，其中饮用正常饮用水的小鼠为对照组（CTR）。胆汁酸干预期间，DIO 小鼠维持高脂饮食，而 *ob/ob* 型小鼠保持对照饮食。定时监测小鼠的食物摄入及饮水情况，并及时更换垫料、食物和饮水。本实验的胆汁酸干预时长为 3 周，在治疗第三周结束时，检测小鼠的体重、空腹血糖水平，并对小鼠断颈法处死，后提取小鼠的肝脏组织用于脂肪积累以及 TG 水平的检测。

### 2.3.3 荧光脂质吸收实验

#### **BODIPY 灌胃液的配置:**

将 BODIPY 粉末溶解在橄榄油中，充分震荡混匀后避光保存，配置成 0.15 mg/mL 的 BODIPY 灌胃液。

#### **实验方法细节:**

对于胆汁酸干预实验一的小鼠，于 0.5 %浓度的 TDCA 或 TUDCA 干预小鼠 3 周后，将小鼠过夜禁食 16 h，称量禁食后小鼠的体重，使用上述 BODIPY 灌胃液对每只小鼠进行灌胃（灌胃体积按照 10  $\mu$ L/g 进行计算）。灌胃两小时后，麻醉小鼠，取出小鼠胃下端 3~3.5 cm 段（回肠段）以及胃下端 3.5~4 cm 段，分别进行切片荧光镜检和吸光度检测。其中，3~3.5 cm 段在切下后冷冻在 OCT 包埋剂中，后进行切片并在荧光显微镜下对空肠的切片进行成像。荧光强度的检测则主要使用了 Image J 软件，每只小鼠随机挑选了 4 张小肠绒毛的荧光图片进行定量（共 18 $\times$ 4 = 72 样），并对组间的定量结果进行了相应的统计学检验。

### 2.3.4 高通量转录组测序及 RT-qPCR 验证

对于胆汁酸干预实验一的小鼠，于 0.5 %浓度的 TDCA 或 TUDCA 饮水干预的第三天，将小鼠麻醉处死，取出小鼠胃下端 3~3.5 cm 段（回肠段），提取小鼠回肠样本中的 RNA，进行高通量转录组测序及后续的验证。

#### 2.3.4.1 高通量转录组测序

使用苯酚-氯仿萃取法和 Trizol 试剂从小鼠回肠样本中提取总 RNA。而后，使用 TruePrep DNA Library Prep Kit 生成小 RNA 测序文库。利用 NovaSeq 6000 测序仪进行测序（Illumina 技术），以每个文库 3000-6000 万个读数的深度下产生了 2 $\times$ 150 bp 的配对末端读数。使用 Fastp 软件筛选，获得高质量的读数。利用 HISAT2 软件以定向模式将高质量读数分别与参考基因组（GRCm39）进行比对。将比对后的结果输入 String Tie 进行转录本的组装和定量。后利用转录组 TPM 法，将每个基因的转录本定量数据转化为 TPM 值，从而评估基因的表达水平。

#### 2.3.4.2 RNA 逆转录反应 (RT - PCR)

使用 Nanodrop 检测 RNA-seq 实验中提取样本中的 RNA 浓度。计算出 1 ug RNA 所需要的样本液体积，将其加入八联管中，并用 ddH<sub>2</sub>O (RNase-free) 补齐总体积至 15 uL。接着分别向每个孔中加入 4 uL 5X HiScriptIII qRT SuperMix 和 1 uL Enzyme Mix，涡旋振荡使管内液体充分混匀。置于 PCR 仪中，按照设置好的热循环程序，进行逆转录反应。具体 RT - PCR 体系如下表所示。

试剂名称	试剂用量
RNA template	To 1ug
ddH <sub>2</sub> O	To 15uL
5X HiScriptIII qRT SuperMix	4uL
Enzyme Mix	1uL

反应结束后，向每个孔中加入 80 uL RNase - free 的 ddH<sub>2</sub>O，将总体积稀释到 100 uL 并震荡混匀，用于后续的 qPCR 反应。

#### 2.3.4.3 实时荧光定量 PCR 反应 (qPCR)

试剂名称	试剂用量
2 × Mix	5 uL
ddH <sub>2</sub> O	3.6 uL
Template	1 uL
F	0.2 uL
R	0.2 uL

按照如图所示的体系在 384 孔板进行上样，并按照设置好的反应程序在 qPCR 仪上设置热循环程序，对样品进行实时荧光定量 PCR，以 *Hprt1* 作为内参基因来检测目标 mRNA 的表达水平。每个样品均设置两个复孔，通过  $\Delta \Delta CT$  值来表示所探究基因 mRNA 的相对表达量。本论文所涉及的相关引物序列见下表。

目标基因	引物序列	
<i>Car1</i>	5'端引物	TATGGAAGCGAAAATGGTC
	3'端引物	CCACCTTTCAGAACAGATTG
<i>Hprt1</i>	5'端引物	GTCCCAGCGTCGTGATTAG
	3'端引物	AGCCCCCTTGAGCACAC

### 2.3.5 检测方法

#### 2.3.5.1 空腹血糖水平检测

小鼠过夜禁食 16 h 后，使用 75 %酒精棉球擦拭小鼠尾部，用消毒手术剪刀剪去 1-2 mm 的小鼠尾尖。待小鼠平静后，从其尾根部向尾尖部按摩，将血液从尾尖挤出，弃去流出的第一滴血液后，用血糖试纸吸取挤出的第二滴血液，插入血糖仪中进行检测空腹血糖值的读取。采血完成后，用灭菌棉球压迫尾尖止血。

#### 2.3.5.2 肝脏脂质提取和 TG 水平检测

于冻台上剪取约黄豆粒大小的小鼠肝脏组织，放入 1.5 mL EP 管中并准确称重，加入 1 mL 新鲜配制的预冷匀浆缓冲液（氯仿:甲醇 = 2:1 v/v）和 2 颗研磨磁珠。使用冷冻组织研磨器（35 Hz, 90 s × 2, 4℃）将肝脏组织打碎成匀浆后，重新加入 2 mL 预冷匀浆缓冲液，于摇床上低速摇动过夜。摇动过夜后，加入 600 μL 预冷的生理盐水，涡旋混匀后离心（2000 g, 10 分钟, 4℃）。待其静置分层后，用注射器小心转移下层溶液，并使用干式氮吹仪吹干溶液。将吹干后得到的肝脏脂质重悬于新鲜配制的缓冲液（丁醇: TritonX - 100: 甲醇 = 0.6: 0.267: 0.133 v/v）中。

肝脏中 TG 水平的测定按照 TG 检测试剂盒的说明书进行操作。取 96 孔酶标板，按照样品的组别和顺序依次在孔底部加入 2.5 uL 样品，随后向一空白孔及另一空白孔中各加入中加入 2.5 uL ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照和 2.5 uL 试剂盒内自带的标准品作为阳性对照。然后向其中各加入试剂盒中的工作液 250 uL，盖上盖子后用锡纸包裹，轻轻震荡混匀后，置于 37 °C 培养箱中孵育 10 min，随后使用酶标仪在 500 nm 波长下测定其吸光度值 A。而后通过下方公式计算即可得到样品中的 TG 含量：

$$\text{TG 含量 (mg/g)} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标样}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W_{\text{组织重量 (g)}}}{V_{\text{提取液}}} \times M_{\text{TG}}$$

### 2.3.5.3 肝脏组织切片的油红 O 染色

#### 油红 O 工作液的配置:

将油红 O 饱和溶液与蒸馏水按 4:1 的体积比充分混合均匀, 置于 70 °C 水浴锅中水浴 30 分钟, 待其自然冷却后, 用定性滤纸过滤, 即可得到油红 O 工作液。

#### 实验方法细节:

将肝脏组织从固定液中取出, 置于 15 % 的蔗糖溶液内冷藏脱水直至沉底, 再转入 30 % 的蔗糖溶液内冷藏脱水沉底; 将脱水后的组织取出, 用滤纸吸干水分, 使用 OCT 包埋剂进行速冻包埋。包埋后, 用冷冻切片机对样本进行切片 (厚度约为 8 μm)。使用上述配置的油红 O 工作液, 将切片浸入油红 O 工作液中避光浸染 10 分钟, 取出切片。将切片浸入 60% 异丙醇中分化 5 秒, 分化后浸入纯水中清洗 10 秒 (浸入-分化过程共进行两次)。最后, 将切片浸入苏木素染液对细胞核进行染色, 水洗, 返蓝再水洗吗, 晾干水分后滴加甘油明胶封片剂封片。

使用显微镜对切片进行检查后, 进行数字切片扫描以及图像采集分析。

### 2.3.6 统计学方法

本研究中涉及的所有统计分析均使用 R (v 0.9.14.115) 和 GraphPad Prism (v 9.0) 进行。本论文实验使用了该软件进行统计学分析, 实验数据显示为 Mean ± SEM, 组间差异统计主要通过 Student 氏 *t* 检验进行, 展示为平均值 ± 标准误差。

## 三、研究结果

### 3.1 TDCA 和 TUDCA 抑制小鼠肠道的脂质吸收水平

为进一步明确 TDCA 和 TUDCA 对小鼠脂质吸收水平的影响,选取 0.5 % 浓度的 TDCA、TUDCA 以及溶剂对 C57BL/6J 小鼠进行为期 3 周的造模 (N = 6), 期间小鼠使用标准饲料 (CD)。本实验选用 BODIPY 作为脂质的“示踪剂”。BODIPY 是一类有机染料,在电磁光谱的可见光和近红外区域能够表现出很强的吸收和发射<sup>[44]</sup>。因其具有极强的荧光性和优异的光稳定性,所以在成像和传感方面被广泛应用<sup>[45]</sup>。将小鼠过夜禁食 16 h 后,称取灌胃前小鼠的体重,按 10  $\mu\text{L/g}$  进行灌胃,在灌胃两小时后,处死小鼠,取小鼠胃下端 3~3.5 cm 段 (回肠段) 进行圆切。将切下的肠段冷冻在 OCT 材料中,切片,并在荧光显微镜下进行成像与检测 (图 7a)。可以明显观察到,TDCA 以及 TUDCA 处理组小鼠小肠绒毛切片的荧光强度较低。

进一步地,使用 ImageJ 软件对图像中的荧光强度进行定量 (图 7b), 其结果也表明,TDCA 和 TUDCA 处理组的小鼠小肠绒毛切片处的 BODIPY 浓度显著低于溶剂对照组。综合图像以及定量信息,可以得出结论:TDCA 和 TUDCA 处理能够抑制小鼠对于脂质的吸收。

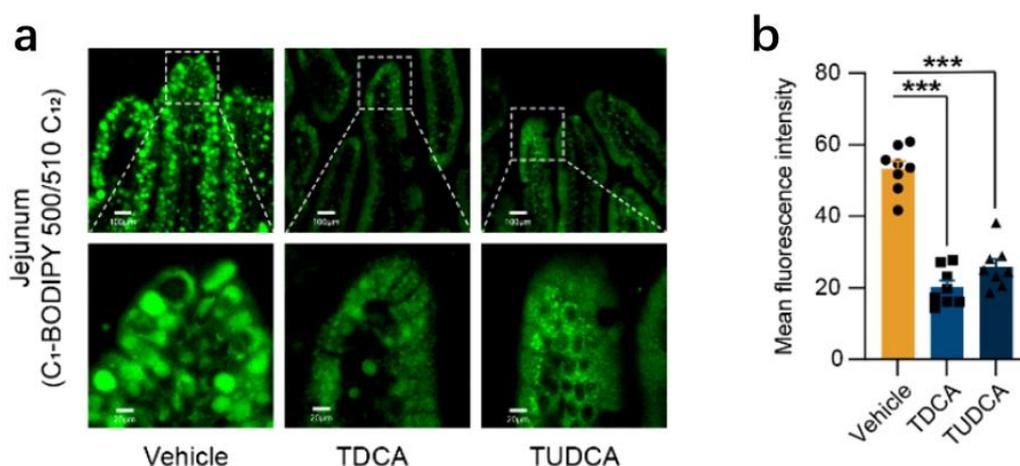


图 7 TDCA 和 TUDCA 对脂质吸收的影响

注: 图 a 为 TDCA、TUDCA 或溶剂处理 1 周后,灌胃偶联 BODIPY 的橄榄油的小鼠肠道切片图像,第 1 排比例尺为 100 $\mu\text{m}$ ,第 2 排比例尺为 20 $\mu\text{m}$ ;图 b 为使用 Image J 软件进行荧光定量的结果,N=24 (6 $\times$ 4),显著性差异通过 Student 氏 *t* 检验确定,\*\*\*表示  $p < 0.001$

### 3.2 TDCA 和 TUDCA 通过下调 *Car1* 的表达抑制小鼠肠道的脂质吸收

使用 0.5%浓度的 TDCA 或 TUDCA 对小鼠 (N = 6) 进行为期 3 天的短期造模, 后麻醉处死, 取小鼠胃下端 3~3.5 cm 段 (回肠段), 提取 RNA, 送往测序公司进行转录组学分析, 观察在机体负反馈调节程度较小的情况下, 小鼠回肠基因的差异表达情况。本次测序共检测 18 个小鼠回肠样本, 检测到表达基因共 32018 个, 表达转录本共 102999 个。基于表达量定量结果, 使用 DESeq2 进行组间差异基因表达的初步分析, 获得两组间发生差异表达的基因, 差异分析软件为: DESeq2, 结果显示: 相较于对照组, TDCA 处理下调了 184 个基因的表达, 上调了 160 个基因的表达, 其中表达量变化显著的基因为 *Car1*、*Ccl21d*、*Aqp8*、*Gm2436*、*Gm43546* 等; TUDCA 处理组相较于对照组, 有 219 个基因的表达下调, 117 个基因显著上调, 其中表达量变化较为显著的基因有 *Car1*、*Ccl21d*、*Aqp8*、*Igkv8-18*、*Gm44503* 等。为确保结果和方向的明确, 我将数据进行了二次的质控, 剔除了检出率小于 50%的基因, 并设置了基因表达差异的筛选阈值:  $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$  以及  $P_{\text{adjust}} \leq 0.05$ , 得到了差异基因表达火山图 (图 8)。

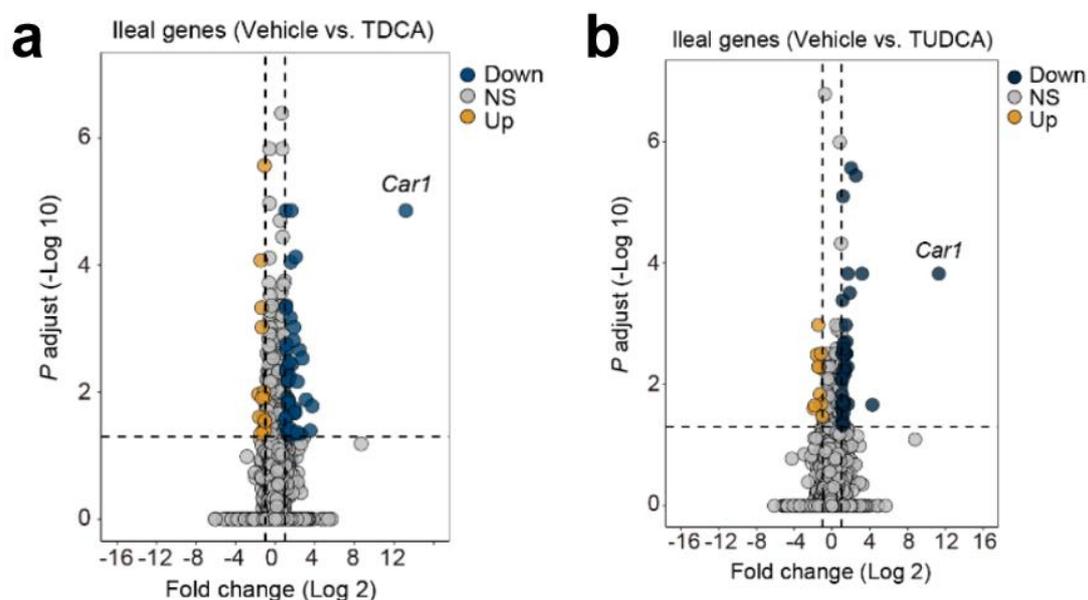


图 8 TDCA 和 TUDCA 治疗下基因表达量差异火山图

注: 本图为使用 TDCA (a)或 TUDCA (b)处理的小鼠基因表达量差异的火山图, 每个点代表一个基因; 阈值为:  $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$  以及  $P_{\text{adjust}} \leq 0.05$ , 其中蓝色圆点表示相较于对照组显著下调的基因, 红色圆点表示相较于对照组显著上调的基因;  $\text{Fold Change}$  为基因的差异表达倍数,  $P_{\text{adjust}}$  通过 Student 氏  $t$  检验计算, 后通过 FDR 进行多重校验

可以看到，不论是 TDCA 处理组还是 TUDCA 处理组，相较于溶剂对照组，*Car1* 基因的表达都下调了 99.99%（表达量低于 CTR 组的  $2^{-12}$ ）。

*Car1* 基因是碳酸酐酶 1 的编码基因，碳酸酐酶的效果是催化二氧化碳和碳酸氢盐之间的相互转换，从而产生质子介导 pH 的变化<sup>[46]</sup>。然而，碳酸酐酶不仅被认为参与了许多细胞和组织中的 pH 调节，还是一种重要的代谢酶<sup>[47]</sup>。在 90 年代，研究证明，抑制线粒体/胞质中的碳酸酐酶会干扰各种细胞、组织和动物模型中脂肪酸的生物合成<sup>[48]</sup>。此外，*Car1* 也是一种重要的与吸收相关的肠上皮细胞标记物，被认为是治疗肥胖的潜在靶点<sup>[49]</sup>。

为进一步验证 *Car1* 基因的表达差异，使用 TDCA 或 TUDCA 造模 3 天的小鼠回肠样品中提取的 RNA 进行逆转录反应，得到回肠基因的 cDNA 样品。并用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。使用 *Hprt1* 作为内参基因，结果如图 9 所示，TDCA 和 TUDCA 处理显著降低了 *Car1* 基因的 mRNA 水平。

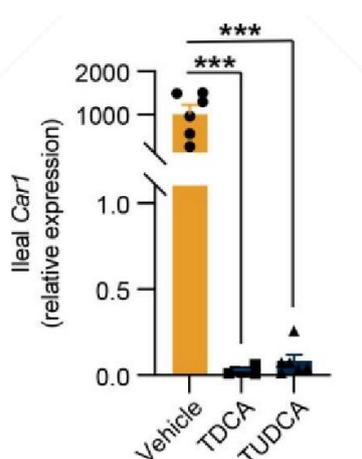


图 9 *Car1* RT-qPCR 验证结果

注：使用 *Hprt1* 作为内参基因来标准化 *Car1* 的表达，显著性差异通过 Student 氏 *t* 检验确定，\*\*\*表示  $p < 0.001$

### 3.3 TDCA 和 TUDCA 在 DIO 和 *ob/ob* 小鼠肥胖治疗方面的应用

鉴于 TDCA 和 TUDCA 治疗肥胖方面的潜力，我们计划在两种小鼠的肥胖模型中测试 TDCA 和 TUDCA 在治疗肥胖方面的应用前景，第一种模型是通过喂养高脂饮食（HFD）来 10 周来模拟的获得性肥胖小鼠模型（DIO）。第二种模型是瘦素基因纯合突变的 *ob/ob* 小鼠（瘦素基因纯合突变小鼠），用于模拟先天性肥胖。在两种小鼠模型中，均使用 TDCA、TUDCA 或溶剂对小鼠进行时长

为 3 周的治疗。以观察 TDCA 和 TUDCA 对于肥胖小鼠体重、空腹血糖水平、肝脏纸质积累以及肝脏甘油三酯水平的影响。

### 3.3.1 TDCA 和 TUDCA 显著降低 DIO 和 *ob/ob* 小鼠的体重

按照体重匹配将每种模型小鼠平均分为 3 组，每组分别给予 0.5 %浓度的 TDCA、TUDCA 或溶剂进行为期 3 周的治疗，在治疗结束时，分别称量每只小鼠的体重，结果显示 TDCA 和 TUDCA 治疗均能显著降低两种肥胖小鼠的体重。其中，TDCA 治疗导致 DIO 小鼠的体重降低了 19.9 %，*ob/ob* 小鼠体重下降了 9.7 %；而 TUDCA 治疗则分别导致 DIO 和 *ob/ob* 组小鼠的体重下降了 16.1 %和 7.4 %（图 10）。

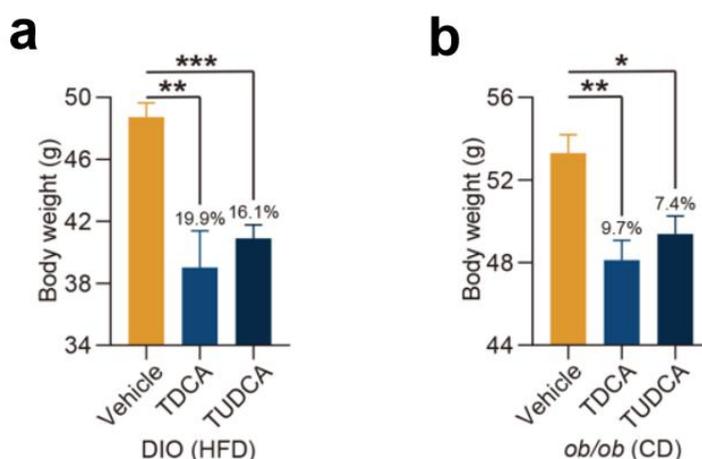


图 10 TDCA 和 TUDCA 对 DIO 和 *ob/ob* 小鼠体重的影响

注：TDCA 和 TUDCA 治疗 3 周后 DIO 小鼠 (a) 和 *ob/ob* 小鼠 (b) 的体重，N=5，显著性差异通过 Student 氏 *t* 检验确定，\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$

### 3.3.2 TDCA 和 TUDCA 显著降低 DIO 和 *ob/ob* 小鼠的空腹血糖水平

将使用 0.5 %浓度的 TDCA、TUDCA 以及溶剂治疗 3 周的小鼠过夜禁食 16 小时，后使用 75 %酒精棉球擦拭小鼠尾部，用消毒手术剪刀剪去 1-2 mm 的小鼠尾尖。待小鼠平静后，使用血糖试纸和血糖仪检测小鼠的空腹血糖水平。结果显示：与对照组小鼠相比，TDCA 和 TUDCA 治疗显著降低了 DIO 和 *ob/ob* 小鼠的空腹血糖水平，并低于高血糖症的临床判定标准（空腹血糖  $< 7.0$  mmol/L）。

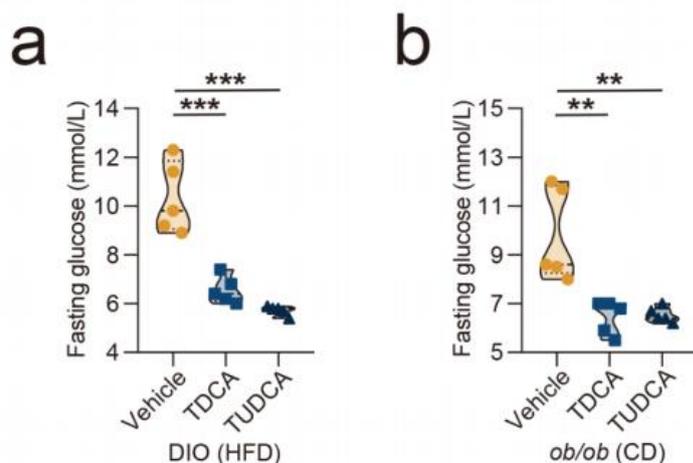


图 11 TDCA 和 TUDCA 治疗对 DIO 和 *ob/ob* 小鼠空腹血糖水平的影响

注：TDCA 和 TUDCA 治疗 3 周后 DIO 小鼠 (a) 和 *ob/ob* 小鼠 (b) 的空腹血糖水平。N=5，显著性差异通过 Student 氏 *t* 检验确定，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$

### 3.3.3 TDCA 和 TUDCA 显著改善 DIO 和 *ob/ob* 小鼠肝脏脂质积累

于 3 周 TDCA 和 TUDCA 治疗结束后对小鼠进行取材，保存小鼠的肝脏、脂肪和血液样品。从固定液中取出小鼠的肝脏样品，脱水后使用 OCT 包埋剂对其进行速冻包埋，制成肝冷冻切片后放入油红 O 染料中，避光染色 15 min，复染清洗后置于显微镜下观察。由于油红 O 能够与脂肪中的中性脂肪和脂蛋白结合，并在显微镜下形成红色沉淀<sup>[50]</sup>，能够观察肝脏中脂肪的分布和积累情况，染色结果表明 TDCA 和 TUDCA 处理能够显著改善肝脏组织中的脂肪积累情况(图 12)。

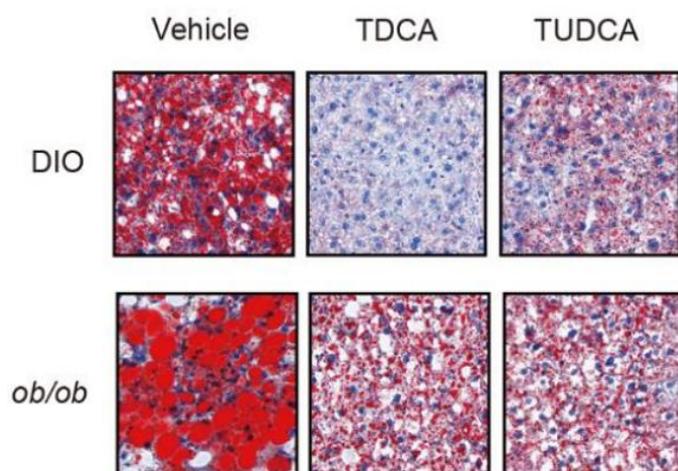


图 12 DIO 和 *ob/ob* 小鼠肝脏油红 O 染色结果

### 3.3.4 TDCA 和 TUDCA 显著降低 DIO 和 *ob/ob* 小鼠肝脏甘油三酯水平

于冻台上切取约 20mg 的肝脏组织，提取肝脂，并使用试剂盒检测 2 个模型小鼠肝脏中的甘油三酯（TG）水平，结果显示 TDCA 和 TUDCA 处理能够显著降低肝脏 TG 水平（图 13）。

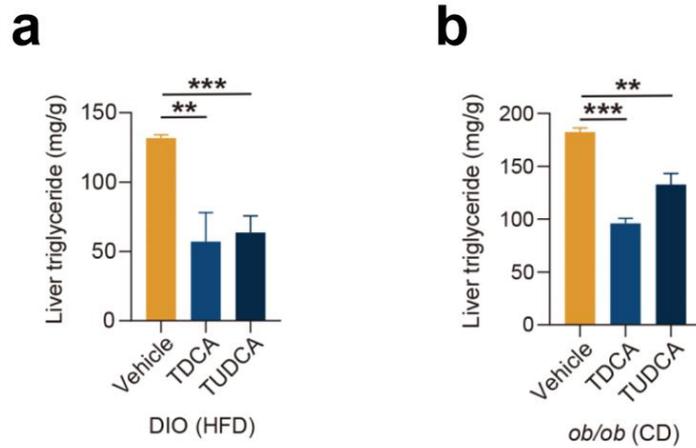


图 13 TDCA 和 TUDCA 对 DIO 和 *ob/ob* 小鼠肝脏 TG 水平的影响

注：TDCA 和 TUDCA 治疗 3 周后 DIO 小鼠（a）和 *ob/ob* 小鼠（b）的肝脏 TG 水平。N=5，显著性差异通过 Student 氏 *t* 检验确定，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$

## 四、讨 论

肥胖是一种复杂的慢性疾病,其发病受多种因素影响,可导致身体结构异常、生理功能紊乱和代谢障碍,从而对健康和福祉产生负面影响<sup>[51]</sup>。在过去的研究中发现,生酮饮食能够造成肥胖人群及实验动物代谢表型上的显著改善;而本课题组的前期工作显示,生酮饮食能够通过上调牛磺酸结合型胆汁酸 TDCA 以及 TUDCA 的水平来介导体重和空腹血糖水平的降低。因此本研究旨在进一步探究 TDCA 和 TUDCA 对脂质吸收水平的影响以及其在治疗肥胖方面的潜在应用。

本研究总共从三个方面探究了生酮饮食介导的特异性胆汁酸 TDCA 和 TUDCA 影响脂质吸收的机制,首先,通过对灌胃了 BODIPY 标记物小鼠的小肠绒毛进行成像,发现 TDCA 和 TUDCA 能够抑制小鼠肠道对于脂质的吸收;而后,从对 RNA-seq 数据的分析和后续的 RT-qPCR 验证中,明确 TDCA 和 TUDCA 作用的机制之一便是显著下调 *Car1* 基因的表达;最后,在治疗应用方面,使用 TDCA 和 TUDCA 对两种肥胖模型小鼠进行了为期 3 周的治疗,结果显示:TDCA 和 TUDCA 能够显著降低肥胖小鼠的体重、空腹血糖水平、肝脏甘油三酯水平并减少了肝脏脂质积累。在临床上,有使用 TUDCA 治疗胆结石的先例,结果表明,TUDCA 治疗对患者无明显的副作用<sup>[52]</sup>。尽管 TDCA 尚未被应用于临床实践,但就本研究的结果而言,TDCA 以及 TUDCA 治疗对于小鼠并无明显的副作用。不过,要明确评估 TDCA 和 TUDCA 的安全性,还需要对它们进行进一步的长期和全面的研究。

本研究也存在着一些不足,如在 TDCA 和 TUDCA 抑制脂质吸收的具体机制上的研究还不够深入,可以针对 RNA-seq 结果中筛选出的其他的基因及其潜在通路进行进一步的探索。此外,在 *Car1* 相关表达的验证方面,只进行了 mRNA 水平的验证,要想更全面地了解 TDCA 和 TUDCA 是如何调控肠道 *Car1* 的表达,以及 *Car1* 的下调是否能够减少肠道的脂质吸收,还需要更多的研究。可进一步设计实验,在蛋白质水平或体外体系中进一步验证 *Car1* 与脂质吸收间的关联,以增强结果的可靠性。此外,有研究显示甘氨酸熊脱氧胆酸(GUDCA)和 TUDCA 同为胆汁酸受体(FXR)的拮抗剂<sup>[53]</sup>,在实施胆汁酸干预的情况下,FXR

信号通路的抑制将如何与 CAR1 信号协调并在代谢调节中发挥作用,目前的研究尚未明晰。

未来的研究可以进一步探讨 TDCA 和 TUDCA 对肠道吸收不同类型脂质的抑制效果,以及在下游机制上的进一步探索,明确 *Car1* 表达量下调与脂质吸收之间的关联。可进一步使用 *Car1* 的激活剂或抑制剂对小鼠进行治疗,探究抑制或激活 *Car1* 的表达是否能够影响小鼠肠道的脂质吸收情况。另外,也可以培育一批 *Car1* 基因敲除小鼠,观察其在代谢表型上的变化。在体外水平上,可以增加一批肠道特异性细胞系验证实验,对肠道细胞使用 *Car1* 的激活剂及抑制剂处理,观察细胞内的脂质积累情况。此外,还可以针对 RNA-seq 的结果,探索其他可能受到 TDCA 和 TUDCA 调控的关键基因,更加全面地理解 TDCA 和 TUDCA 抑制脂质吸收的机制。考虑到胆汁酸代谢路径和信号通路的复杂性,如在 FXR 信号通路与 CAR1 信号之间的互相协调上,亦可设计相关实验进行探究。最后,应用上,未来可以探究 TDCA 和 TUDCA 在长期治疗中的稳定性和安全性,并进一步研究其对肥胖相关疾病如代谢综合征和脂肪肝的影响机制。

综上所述,本研究聚焦于特异性胆汁酸 TDCA 和 TUDCA,深入探讨了它们降低体重和空腹血糖水平的机制。荧光探针活体染色实验为 TDCA 和 TUDCA 抑制肠道脂质吸收提供了直接证据。而 TDCA、TUDCA 治疗后小鼠肠道组织的高通量转录组测序结果表明 TDCA 和 TUDCA 能够显著下调肠道 *Car1* 基因的表达,为 TDCA、TUDCA 抑制脂质吸收提供了潜在的分子靶点。最后,我们发现 TDCA 和 TUDCA 能够显著降低肥胖小鼠的体重、空腹血糖水平及肝脏脂质积累水平,为 TDCA 和 TUDCA 成为治疗肥胖和相关代谢疾病的新候选药物提供了一定的科学依据和理论基础。

## 参考文献

1. World Health Organization. Fact sheet: obesity and overweight. [https://www.who.int/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity#tab=tab_1).
2. Rasaei N, Heidari M, Esmaeili F, et al. The effects of prebiotic, probiotic or synbiotic supplementation on overweight/obesity indicators: an umbrella review of the trials' meta-analyses[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15:1277921.
3. Weir CB, Jan A. BMI Classification Percentile And Cut Off Points[EB/OL]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541070/>.
4. World Obesity Federation. World Obesity Atlas 2024[EB/OL]. <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=22>.
5. Bray G, Kim K, Wilding J, et al. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation[J]. *Obes Rev*, 2017, 18:715-723.
6. Mohamadi A, Shiraseb F, Mirzababaei A, et al. Circulating inflammatory markers may mediate the relationship between healthy plant-based diet and metabolic phenotype obesity in women: A cross-sectional study[J]. *Int J Clin Pract*, 2022, 2022:8099382.
7. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15:288-298.
8. Bazshahi E, Sheikhhossein F, Amini MR, Shab-Bidar S. The association of dietary energy density and the risk of obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Int J Clin Pract*, 2021, 75:e14291.
9. Gholami F, Rasaei N, Samadi M, et al. The relationship of genetic risk score with cardiometabolic risk factors: a cross-sectional study[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22:459.
10. Baylie T, Ayelgn T, Tiruneh M, et al. Effect of Ketogenic Diet on Obesity and Other Metabolic Disorders: Narrative Review[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2024, 17:1391-1401.
11. ZHU H, BI D, ZHANG Y, et al. Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1):11.
12. Wheless, J. W. History of the ketogenic diet[J]. *Epilepsia*, 2008, 49 Suppl 8:3-5.
13. ZHU H, BI D, ZHANG Y, et al. Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1):11.
14. Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: updated recommendations of the International Ketogenic Diet Study Group[J]. *Epilepsia Open*, 2018, 3(2):175-192.
15. Goday A, Bellido D, Sajoux I, et al. Short-term safety, tolerability and efficacy of a very low-calorie-ketogenic diet interventional weight loss program versus

- hypocaloric diet in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Nut Diabetes*, 2016, 6(9):e230-e30.
16. Liu H, Yang Y, Wang Y, et al. Ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy in adults: a meta-analysis of observational studies[J]. *Epilepsia Open*, 2018, 3(1):9-17.
  17. Li S, Zhuge A, Wang K, Lv L, et al. Ketogenic diet aggravates colitis, impairs intestinal barrier and alters gut microbiota and metabolism in DSS-induced mice[J]. *Food Funct*, 2021, 12(20):10210-10225.
  18. Lu JF, Zhu MQ, Xia B, et al. GDF15 is a major determinant of ketogenic diet-induced weight loss[J]. *Cell Metab*, 2023, 35(12):2165-2182.
  19. Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004, 70(3):243-251.
  20. Owen, O. E. Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation[J]. *Biochem.Mol. Biol. Educ*, 2005, 33:246-251.
  21. DIMITRIADIS G, MITROU P, LAMBADIARI V, et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 93 Suppl 1:S52-9.
  22. Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(1):42-52.
  23. Baylie T, Aylgn T, Tiruneh M, et al. Effect of Ketogenic Diet on Obesity and Other Metabolic Disorders: Narrative Review[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2024, 17:1391-1401.
  24. Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004, 70(3):243-51.
  25. Lazarević S, Đanić M, Goločorbin-Kon S, et al. Semisynthetic bile acids: a new therapeutic option for metabolic syndrome[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146:104333.
  26. Lombardo D. Bile salt-dependent lipase: its pathophysiological implications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1533(1):1-28.
  27. Thompson GR. Absorption of fat-soluble vitamins and sterols[J]. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 1971, 5:85-89.
  28. Saeed A, Hoekstra M, Hoeke MO, et al. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(5):496-512.
  29. Fuchs CD, Trauner M. Role of bile acids and their receptors in gastrointestinal and hepatic pathophysiology[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(7):432-450.
  30. McGlone ER, Bloom SR. Bile acids and the metabolic syndrome[J]. *Ann Clin Biochem*, 2019, 56(3):326-337.
  31. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis[J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72:137-74.
  32. Ferdinandusse S, Denis S, Faust PL, et al. Bile acids: the role of peroxisomes[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(11):2139-47.
  33. Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, et al. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(4):236-247.

34. Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, et al. Human cecal bile acids: concentration and spectrum[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1):G256-63.
35. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, et al. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1):41-50.
36. Zwicker BL, Agellon LB. Transport and biological activities of bile acids[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(7):1389-98.
37. Jones BV, Begley M, Hill C, et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(36):13580-5.
38. Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14(7):2584-98.
39. XiaoLi, Jie Yang, Xiaofeng Zhou, et al. *Nat. Metab*, 2024, in press.
40. CHIANG J Y. Bile acids: regulation of synthesis[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(10):1955-66.
41. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, et al. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1):41-50.
42. Jones BV, Begley M, Hill C, et al. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(36):13580-5.
43. XiaoLi, Jie Yang, Xiaofeng Zhou, et al. *Nat. Metab*, 2024, in press.
44. Bandi V, Das SK, Awuah SG, et al. Thieno-pyrrole-fused 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-fullerene dyads: utilization of near-infrared sensitizers for ultrafast charge separation in donor-acceptor systems[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(21):7571-4.
45. Das S, Dey S, Patra S, et al. BODIPY-Based Molecules for Biomedical Applications[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12):1723.
46. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7:168-81.
47. Supuran CT. Carbonic anhydrases and metabolism[J]. *Metabolites*, 2018, 8:25.
48. Chegwidden WR, Spencer IM. Carbonic anhydrase provides bicarbonate for de novo lipogenesis in the locus[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, 115:247-54.
49. Supuran, C. T. Anti-obesity carbonic anhydrase inhibitors: challenges and opportunities[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, 37:2478-2488.
50. Escorceia W, Ruter DL, Nhan J, et al. Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining[J]. *J Vis Exp*, 2018, (133):57352.
51. Dhurandhar NV, Petersen KS, Webster C. Key Causes and Contributors of Obesity: A Perspective[J]. *Nurs Clin North Am*, 2021, 56(4):449-464.
52. Gallo V, De Micheli AG, Chiandussi L. Tauroursodesossicolico (TUDCA) vs UDCA nella dissoluzione dei calcoli della colecisti. Risultati di uno studio in singolo cieco. *Clin Ter*, 1993, 143(5):421-8.

53. Sun L, Xie C, Wang G, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin[J]. *Nat Med*, 2018, 24(12):1919-1929.

# 致 谢

又到凤凰花都开放的时候，文末搁笔，思绪繁杂。四年的本科时光如白驹过隙，忽然而已。回首这四年每一个辗转难眠或是捧腹大笑的时刻，竟理不出一条清晰的故事线。

大抵是因为见过了太多 20 岁的气宇轩昂，20 岁的平步青云，20 岁的光芒万丈，让我觉得自己的 20 岁也不过如此。站在 20 岁的十字路口，选择什么，即将得到又会失去什么，我没有答案。

或许正如木心所说：“我明知生命是什么，是时时刻刻不知如何是好，所以听凭风里飘来花香泛滥的街，习惯于眺望命题模糊的塔。”

又或许，“选”这个动作本身就有意义。

所幸，拥有一个的温暖互助的课题小组，一群随时发疯的知心好友，一场说走就走的难忘旅行，一份坚定不移的向前决心。

想要感谢的人实在太多，在成长的道路上，因为有你们才让我成为了今天的“我”。

一朝沐杏雨，一生念师恩。首先我想感谢我的导师洪尚宇研究员。还记得在强基计划和科研项目的双重压力下我的痛苦和纠结，是洪老师办公室的大门温暖地向我打开，而后在课题组的每一天，不论什么时候敲洪老师的门，他都会亲自走来为我们开门，聆听我们在科研和平时生活中需要解决的问题。在申请校曦源项目以及完成毕业设计和论文期间，从文献调研、课题选题、研究思路到结果分析都离不开洪老师的指导和帮助。洪老师以他乐观从容、严谨谦虚的生活和学术态度教给我要如何“讲一个好故事”，“做一个有温度的人”。

感谢课题组的小伙伴们，李潇师兄、戴晨师姐、小滕师兄、奕莲师姐、心怡师姐、丹丹师姐、啸楠师兄.....课题组是我在江湾的第一个家，我们有生日月、有定期的聚餐、有组会的每一杯咖啡、有私下的聚会.....课题组的小伙伴们之间早已不是普通的同事关系，而成为了彼此重要的好朋友。

在这个大家庭里，我最感谢的人是李潇师兄和戴晨师姐。不论遇到什么科研和生活上的问题，只要一条微信消息，李潇师兄总能如约出现在 2 楼，用他够硬的科研实力和敏锐的科研直觉发现问题、解决问题、提出可能的方向。可以说，

潇哥是我的“科研底牌”，是不论什么时候都能让人安心的存在。戴晨师姐，我们一起通过了无数次4楼动物房、发育所、细胞房的风淋，度过那些人生中“最没意义”的30s；一起摸索过实验室各式各样的仪器，提过各种各样组织中的RNA，等待过无数次1.5h的PCR、22min的电泳和240s的组织破碎仪，感谢你在科研道路上的陪伴，谢谢你带我进入湿实验的世界。

感谢我的朋友们，喜欢说出口的话永远有回应，喜欢天马行空的旅行计划被执行，喜欢随时随地的拉扯和打闹，喜欢推心置腹的交谈和放肆的哭笑，谢谢你们托住了我本应孤独悲伤的灵魂。“青山一道同云雨，明月何曾是两乡”，很庆幸能够成为你们的朋友，世中逢尔，胜过千万泛泛之交。

感谢永不褪色的山楂麟，虽然莫名其妙就变成了“大机制玩家”，虽然我其实并不擅长，但真的很喜欢大家因为喜欢一样的东西而聚在一起。开不出大哥闪身进入废都，绝美吟唱“阿卡贝拉”，“戒了烟我不习惯”，888的鸿姐和海底捞大学生69折.....这些种种会不会都装在一枚名叫时间的叙事性胶囊里，而“爱”，才是诡计的全部意义。

春晖寸草，山高海深。感谢我的父母，感谢他们用朴素真挚的爱陪伴我走过人生的每个阶段，感谢他们让我在一个沐浴了温暖和快乐的家庭之中长大，感谢他们为我提供富足的生活和坚实的后盾让我敢于追寻更大更广阔的人生。谢谢你们，愿身体健康，愿万事胜意。

最后，节选喜欢诗歌的一部分，希望你我都能在21世纪勇敢、清醒、温柔、一尘不染。

听起来不可思议，我真的迷恋着

一枝玫瑰有刺的部分

我爱这温柔又残酷的人间

爱那些失败者的永不认命

我爱废墟，爱有漏洞的真理

我甚至爱我们的失之交臂

因为，它包含着上述的一切  
此生的永不再见，不像结局  
在茫茫无边的轮回中  
更像我们故事的序曲

——李元胜《给》